

## Beta<sub>2</sub>-Microglobulin に関する研究

第 I 編 その免疫化学的性状ならびに  
Radioimmunoassay による臨床測定知見

西 岡 文 彦

札幌医科大学内科学第一講座 (指導 和田武雄教授)

### Studies on $\beta_2$ -microglobulin

#### I. On its Immunochemical Properties and the Clinical Results Determined by Radioimmunoassay

Fumihiko NISHIOKA

*Department of Internal Medicine (Section I), Sapporo Medical College  
(Director: Prof. T. Wada)*

#### Summary

A low molecular weight  $\beta_2$ -microglobulin ( $\beta_2\mu$ ) was isolated from urine of tubular proteinuria and its immunochemical properties were investigated. Serum levels and urinary excretion of  $\beta_2\mu$  were determined in healthy control and patients with various renal dysfunction by radioimmunoassay. The following results were thus obtained.

1) The mean values of serum  $\beta_2\mu$  of control subjects were 1.40  $\mu\text{g}/\text{m}\ell$  in subjects under sixty and 2.28  $\mu\text{g}/\text{m}\ell$  in persons over sixty, respectively. No difference between male and female was found. About half of the elderly persons surveyed had mild hypertension. However, no definite influence of the mild hypertension was seen on the increase of  $\beta_2\mu$  levels. The serum levels showed a tendency to increase with aging, and a correlation was found between serum  $\beta_2\mu$  and serum creatinine levels. It was suggested that the relatively high levels of serum  $\beta_2\mu$  in elderly persons might be related to the decrease of the glomerular filtration rate.

2) The mean values of urinary  $\beta_2\mu$  and urinary excretion ratio of  $\beta_2\mu$ /total protein determined in spot urine specimens from healthy subjects under sixty were 0.07  $\mu\text{g}/\text{m}\ell$  and 0.28%, respectively. These values showed a fair increase in elderly persons in contrast to younger adults. There was influence of mild hypertension on their urinary levels in elderly persons. However, there was no difference on the amounts of urinary total protein between younger adults and elderly persons. It was, therefore, suggested that the effects of aging may be involved in the reduction of tubular function.

3) In renal disorders, it was suggested that quantitative determinations of  $\beta_2\mu$  and excretion of  $\beta_2\mu$ /total protein in spot urine specimens would be useful for the detection of tubular proteinuria.

4) Apparently increased urinary levels of  $\beta_2\mu$  in patients with multiple myeloma and other malignancies were seen. It was suggested that the results might reflect the increased serum concentrations of  $\beta_2\mu$  in these malignancies to some extent.

5) Depositions of  $\beta_2\mu$  in renal tubular cells were demonstrated by the immunofluorescent technique, suggesting that the metabolic site of  $\beta_2\mu$  in the kidney might be the renal tubules.

#### 緒 言

蛋白尿は糸球体の透過性亢進, もしくは尿細管の再吸収能低下, あるいはその両者の合併した病態を反映し<sup>1)</sup>, 腎障害の症状として重視される。

Flynn 一派<sup>2)</sup>は従来アルブミン尿として一括されていた蛋白尿をその組成分析によって尿細管障害時における蛋白尿と糸球体障害時の蛋白尿とに区別することの可能性に触れ, その後の研究においても尿細管性蛋白尿には低分子蛋白 (以下 LMW-蛋白) の排泄が多く, 電気泳動的に血漿蛋白

自由来の  $\alpha_2$ 、 $\beta$ - および  $\gamma$ -glob. 領域の蛋白増加が特徴的とされた。一方 Berggård ら<sup>3)</sup> はこの LMW-蛋白の中から  $\beta_2$ -microglobulin (以下  $\beta_2\mu$ ) を単離精製したが、その後 Peterson ら<sup>4)</sup> は尿中  $\beta_2\mu$  の定量が糸球体障害と尿細管障害との鑑別に有用であるとして注目した。本邦においても野見山<sup>5)</sup>、木村ら<sup>6)</sup> はカドミウム中毒症における腎障害との関係を報告した。

本論文においては尿より単離した  $\beta_2\mu$  について免疫化学的分析を施し、これを二抗体 radioimmunoassay 法によって各種病態時の血清ならびに尿中  $\beta_2\mu$  測定に応用し、同時に腎の蛍光抗体法による観察を行なって知見を得たので報告する。

## 実験方法

### 1) 試料と対象について

尿試料について：蓄尿は窒化ソーダを適量加え 24 時間分を集め、Fanconi 症候群の尿について  $\beta_2\mu$  精製を図ったが、一般には spot 尿について実験を進めた。尿は pH 6~7 の間に修正後  $-20^\circ\text{C}$  に凍結保存し、原則として 2 週間以内に測定に供した。

正常対照人尿は 28 歳~87 歳 (平均年齢 53.9 歳) までの 60 例 (男子 32, 女子 28) から得、患者尿としては各種腎疾患 11 例 (慢性腎炎 5 (ただしいずれも人工透析療法をうけていない)、ネフローゼ症候群 2, 多発性嚢胞腎症 2 および糖尿病性腎症、Fanconi 症候群各 1 で、血清クレアチニン (Cr) は  $0.6\sim 11.1\text{ mg/d}\ell$ )、各種癌 13 例 (胃癌 6, 肺癌 3 その他 4 で、血清 Cr は  $0.4\sim 1.8\text{ mg/d}\ell$ )、多発性骨髄腫 15 例 (IgG 型 7, IgG+Bence-Jones (BJP) 型 2, IgA 型 2, BJP 型 3, IgG+IgA 型 1 で、血清 Cr は  $0.4\sim 6.2\text{ mg/d}\ell$ ) および白血病 9 例 (急性骨髄性白血病 5, 慢性骨髄性白血病 4 で血清 Cr は  $0.5\sim 1.0\text{ mg/d}\ell$ ) より得たが、それらの蛋白量は  $3.3\sim 653.3\text{ mg/d}\ell$  の値を示した。

血清試料について：正常対照成人血清は尿試料を得た対象の中から 19~86 歳 (平均年齢 54.3 歳) までの 102 例 (男子 43, 女子 59) で、それらの血清 Cr は 83 例について  $0.8\sim 1.3\text{ mg/d}\ell$  であった。

患者血清は各種腎疾患 26 例から得たが、慢性腎炎 19 例のうち 12 例は週 1~2 回血液透析療法をうけている。これらの例では透析前に血清を得た。その他ネフローゼ症候群 3 例、多発性嚢胞腎症 2 例、糖尿病性腎症および Fanconi 症候群の各 1 例で、それらの血清 Cr は  $0.6\sim 23.4\text{ mg/d}\ell$  である。

血清は測定時まで  $-20^\circ\text{C}$  に凍結保存された。

腎組織試料について：IgA ( $\kappa$ ) 型多発性骨髄腫および球麻痺により死亡した 2 剖検例それぞれから、 $1\times 5\text{ mm}$  大

の腎切片数ヶずつを採取し、冷 95% エタノール中で一昼夜固定した。固定までの時間は死後 3 時間以内である。

### 2) $\beta_2\mu$ の精製

さきに  $\beta_2\mu$  の精製法について報告したが<sup>7)</sup>、今回は Fanconi 症候群の尿を出発材料として、Bernier<sup>8)</sup> および Ohsawa ら<sup>9)</sup> の方法に準じて行なった。まず硫酸半飽和法で沈澱を分け、これを 0.01 M トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) で平衡化した DE52 (Whatman Co.)  $2.2\times 45\text{ cm}$  カラムに添加し、0.01 M NaCl と 0.1 M NaCl を含む同緩衝液各 1  $\ell$  で塩濃度勾配を作成して連続溶出を行なった。O. D. 280 nm の測定と、特異抗  $\beta_2\mu$  血清 (#055, Dakopatts) を用いてモニターして  $\beta_2\mu$  含有分画を得、これを 0.01 M トリス塩酸緩衝液で透析後、DE52 カラムで再分画した。溶出液は 0.02 M NaCl と 0.07 M NaCl を含む同緩衝液各 1  $\ell$  の勾配で連続溶出を行ない、 $\beta_2\mu$  含有分画を濃縮し、これをさらに 1 M NaCl を含む 0.1 M トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) で平衡化した Sephadex G-100,  $2.2\times 90\text{ cm}$  カラムで分画後、蒸留水を外液として透析して凍結乾燥保存した。

### 3) 抗血清について

抗  $\beta_2\mu$  血清としては特異抗  $\beta_2\mu$  血清 (#064, #055, Dakopatts) のほか、家兎についてさきの報告<sup>7)</sup> のごとく作製した抗血清 (#NG1) と今回下記のごとく作製した高力価 (#NG2) のものを使用した。また抗ヒト全血清、抗ヒト尿蛋白血清、抗ヒト IgG 血清はいずれも家兎について作製したものを用い、その他抗  $\kappa$ 、抗  $\lambda$  鎖血清 (Behringwerke Lab.) を使用した。

高力価の抗  $\beta_2\mu$  血清を作製する場合は、多発性嚢胞腎症患者尿から Fanger ら<sup>10)</sup> の方法に準じて精製した  $\beta_2\mu$   $0.1\sim 0.3\text{ mg}$  を complete Freund's adjuvant に混合して 2 週間隔で 5 回家兎に免疫し、得られた抗血清を尿凍結乾燥粉末 1 mg で吸収し、40% 硫酸飽和沈澱法で IgG 成分を分けて用いた。

### 4) $\beta_2\mu$ の分析

免疫拡散法および免疫電気泳動法には 1.2% agarose と veronal 緩衝液 (pH 8.6,  $\mu=0.025$ ) を使用した。Disc 電気泳動法は Davis<sup>11)</sup> の方法に準じた。polyacrylamide gel 濃度は 7.5%, Canaco 電気泳動装置を使用し、0.5% amido-black 染色を施した。 $\beta_2\mu$  の分子量測定には SDS-polyacrylamide gel 電気泳動法を応用した<sup>12)</sup>。gel 濃度は 12.5% を用い、0.05% Coomassie blue 染色を施した。分子量測定用標準蛋白質としては Schwarz/Mann 社製 Marker Kit を用いた。等電点分画法は Vesterberg ら<sup>13)</sup> の方法に準じ、ampholine は pH 3~10 の範囲を使用して 110 ml 用 LKB カラムで行なった。 $\beta_2\mu$  のアミノ酸分析は試料 0.272 mg を 1 ml の 6 N-HCl で  $110^\circ\text{C}$ , 24 時間加

水分解後, 日本電子 JLC-6 AH 型 amino acid analyzer を用いた。

### 5) $\beta_2\mu$ の測定

さきに二抗体一元免疫拡散法により血清  $\beta_2\mu$  定量を試みて一部発表したが, 尿中  $\beta_2\mu$  濃度は微量で測定困難のため chloramine T 法を用いた抗原標識による二抗体 radioimmunoassay (以下二抗体 RIA)<sup>14)</sup> による測定法を以下のごとく確立した。

$\beta_2\mu$  の  $^{125}\text{I}$  による標識: 精製  $\beta_2\mu$  凍結乾燥粉末 61  $\mu\text{g}$  を 0.05 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) 30  $\mu\text{l}$  に溶解し,  $\text{Na-}^{125}\text{I}$  (第 1 化学) 0.7 mCi を加え, 次いで 40 mg/10 ml の chloramine T 溶液 10  $\mu\text{l}$  を加えて反応させ, 45 秒後に 300 mg/10 ml のメタ重亜硫酸 Na 10  $\mu\text{l}$  を加えて反応を停止させた。incubation 緩衝液 (0.3% BSA, 0.02%  $\text{NaN}_3$  を含む 0.05 M リン酸緩衝液, pH 7.4) 0.2 ml を加え, Sephadex G-25 カラム (1 $\times$ 30 cm) で標識  $\beta_2\mu$  と free  $^{125}\text{I}$  を分離し

た。この方法で  $\beta_2\mu$  の約 85% が標識された。

標識  $\beta_2\mu$  と抗  $\beta_2\mu$  血清の反応の特異性を確認するために 15,000 cpm の標識  $\beta_2\mu$  0.1 ml に段階的に希釈した抗  $\beta_2\mu$  血清 0.1 ml を加え, 二抗体法による抗血清の適定曲線を作成した。適定曲線より標識  $\beta_2\mu$  は抗  $\beta_2\mu$  血清 (#055, #064, #NG 2) と結合能を示すが, 抗  $\kappa$  鎖血清, 抗  $\lambda$  鎖血清, 抗 IgG 血清, 抗ヒト全血清および抗ヒト尿蛋白血清との反応では全く結合性を示さないことによって反応の特異性を確認した。 $\beta_2\mu$  の実測には抗  $\beta_2\mu$  血清 (#055) を使用した。

測定手技: プラスチックチューブ (1 $\times$ 5 cm) に適量希釈抗  $\beta_2\mu$  血清 0.1 ml (第 1 抗体) に  $\beta_2\mu$  標準品または検体 0.1 ml を加えて混合し, 4°C で反応させる。24 時間後に約 15,000 cpm の標識  $\beta_2\mu$  0.1 ml を加え, 次いで希釈正常家兎血清 (第 1 化学) 0.1 ml を加え, 37°C, 1 時間および 4°C, 3 時間反応させ, 反応後第 2 抗体 (希釈ヒツジ抗家兎 IgG

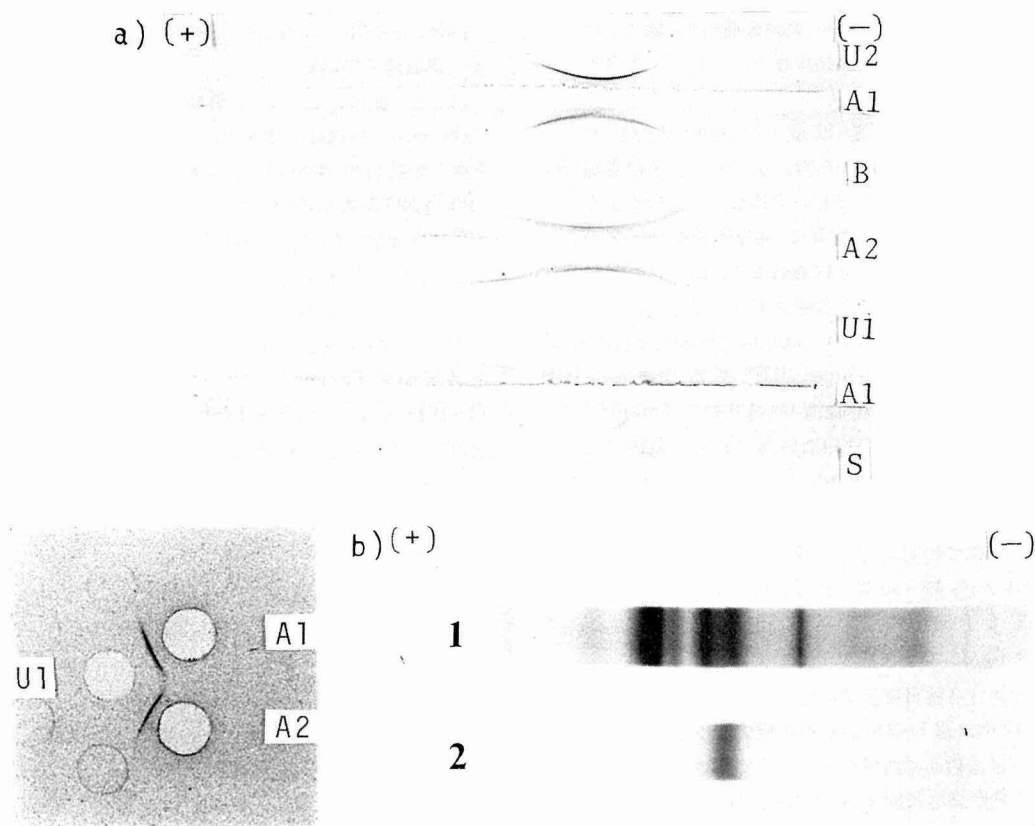


Fig. 1 a): Immunoelectrophoretic and immunodiffusion pattern A1=Anti- $\beta_2\mu$  (#NG 2), A2=Anti- $\beta_2\mu$  (#055), U1=Urine of Fanconi's syndrome, U2=Urine of polycystic kidneys, B=purified  $\beta_2\mu$   
b): Disc electrophoretic pattern 1=original urine of Fanconi's syndrome, 2=purified  $\beta_2\mu$

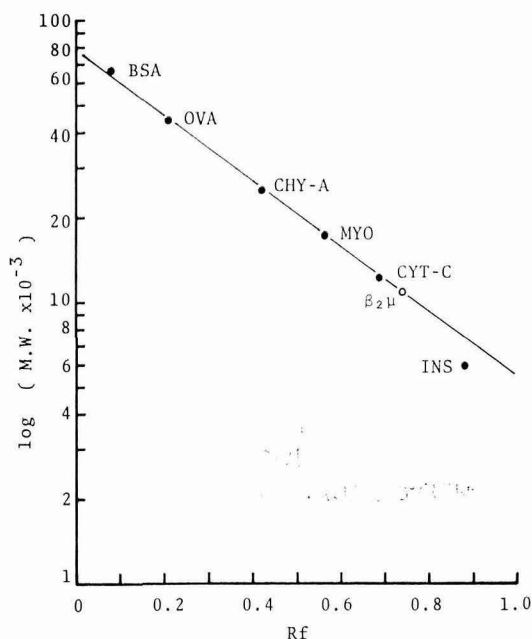


Fig. 2 Standard curve in the 12.5% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. The molecular weight of  $\beta_2$ -microglobulin was found to be approximately 11,000.

血清, 第1化学) 0.1 ml を加え, 攪拌後 4°C で反応させる。18-24 時間後抗原抗体反応沈澱物を遠心分離し LKB-Wallac 80,000 で1分間計測した。1回測定ごとに positive count (pc,  $\beta_2\mu$  標準品の代りに incubation 緩衝液をおいたもの), negative count (nc,  $\beta_2\mu$  標準品と抗  $\beta_2\mu$  血清の代りに incubation 緩衝液をおいたもの) を設け, 反応の特異性を検定した。pc (=  $B_0/T$ ) は 30~40%, nc は 2% 以下であった。

後述のごとく標準曲線を設け,  $\beta_2\mu$  の “zero” count に対する  $\beta_2\mu$  標準品の結合阻止能の比 ( $B/B_0$ ) で表わしたが,  $\beta_2\mu$  5~20 ng/ml の範囲で標準曲線は直線性を示した。また適当に希釈した3種の抗  $\beta_2\mu$  血清 (#055, #064, #NG2) によるそれぞれの標準曲線を比較検討した。なおこの場合  $\beta_2\mu$  を含む尿試料を段階的に希釈 (1/500~1/50,000) していくとその曲線は標準曲線にほぼ一致し, 3種の抗  $\beta_2\mu$  血清の lot 間には差はみられなかった。標準曲線に示された  $\beta_2\mu$  の単位は Phadebas  $\beta_2$ -micro test の  $\beta_2\mu$  標準品より換算して表示した。血清試料は 231 倍, 尿試料は遠心分離後の上清を 6~11 倍に incubation 緩衝液で希釈して使用したが, scale over した検体については必要に応じて希釈を変えた。再現性の吟味の上では技術的変動による誤差は 9% 以内に止まった。

Table 1 Amino acid composition of the low molecular weight protein isolated from the urine of Fanconi's syndrome

Amino acid	To nearest integer ( residues/molecule <sup>a</sup> )	$\beta_2$ -microglobulin ( residues/molecule )	
		b	c
Aspartic acid	12	12	12-13
Threonine <sup>d</sup>	5	5	5
Serine <sup>e</sup>	9	10	8
Glutamic acid	12	11	11-12
Proline	6	5	3
Glycine	3	3	3-4
Alanine	2	2	2-3
Half-cystine	1	2	trace
Valine	7	7	6-7
Methionine	1	1	1
Isoleucine	5	5	4-5
Leucine	7	7	7
Tyrosine	6	6	5-6
Phenylalanine	5	5	5
Histidine	4	4	4
Lysine	8	8	8
Ammonia	N.D.	9	11
Arginine	5	5	5
Tryptophan	N.D.	2	N.D.
Total ( excluding Ammonia )	98 <sup>f</sup>	100	

N.D.=not determined

All tables were values from 24h hydrolysis.

a. Calculated on the basis of 7.0 residues of leucine per molecule.

b. Data from Berggård et al ( 1968 )

c. Data from Ohsawa et al ( 1973 )

d. 3% Correction was made to correct for destruction during acid hydrolysis.

e. 10% Correction was made to correct for destruction during acid hydrolysis.

f. Total values were summed excluding Tryptophan.

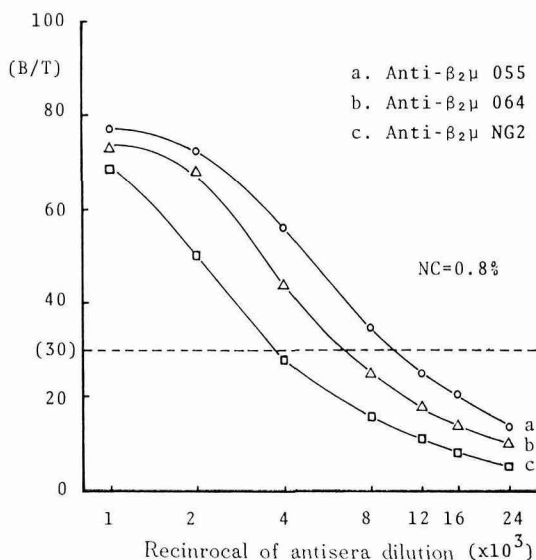


Fig. 3 Dose response curve of anti- $\beta_2$ -microglobulin sera

6) 抗  $\beta_2\mu$  血清による間接蛍光抗体法

冷 95% エタノール固定腎組織を低温パラフィンに包埋し、厚さ  $5\mu$  の組織切片を作成した。切片に 20 倍希釈抗  $\beta_2\mu$  血清 (#055, Dakopatts) を室温 30 分間反応後洗浄し、次いで 20 倍希釈 FITC 結合ヒツジ抗家兎 IgG 血清 (Behringwerke Lab.) で 30 分反応させ、再洗浄後リン酸緩衝化 50% グリセリン液を mount 後 Nikon 落射型蛍光顕微鏡で観察した。蛍光の特異性を確認するため阻止試験を行なった。なお切片の一部について H-E 染色を施した。

## 7) その他の測定について

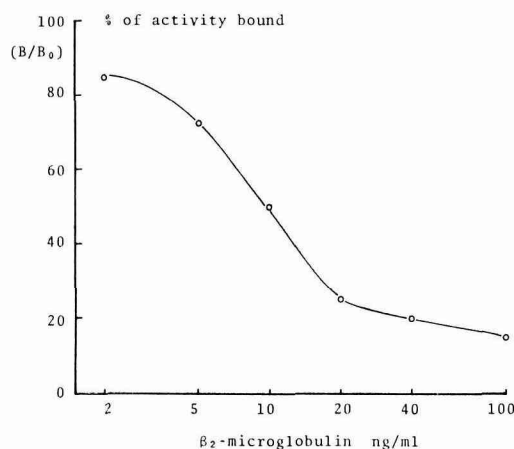


Fig. 4 Standard curve of  $\beta_2$ -microglobulin by the double antibody RIA

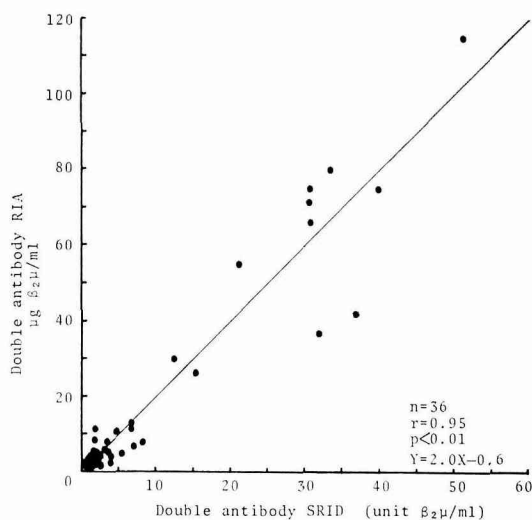


Fig. 5 Correlation between serum  $\beta_2$ -microglobulin concentrations measured by the double antibody single radial immunodiffusion and the double antibody radioimmunoassay

Table 2 Serum  $\beta_2$ -microglobulin ( $S-\beta_2\mu$ ) concentrations in healthy subjects

1) Adult group			
Sex	Age years (mean)	Number of subjects	S- $\beta_2\mu$ $\mu\text{g/ml}$ ( $M \pm SD$ )
Male	20-57 (29.9)	17	$1.48 \pm 0.25$
Female	19-56 (39.0)	39	$1.37 \pm 0.36$
Average for adult group		56	$1.40 \pm 0.33$
2) Aged group			
Male	61-86 (76.7)	26	$2.42 \pm 0.45$
Female	66-86 (75.9)	20	$2.10 \pm 0.48$
Average for aged group		46	$2.28 \pm 0.49$

血清 Cr の測定には対象の都合により 2 つの方法が用いられ、正常対照については creatinine test Kit (Wako, 正常値は  $1.4 \text{ mg/dl}$  以下)、患者については自動分析法 (正常域  $1.1 \text{ mg/dl}$  以下) が用いられた。また尿蛋白はスルホサリチル酸法で測定した。

## 実験成績

1)  $\beta_2\mu$  の精製, その分析結果と二抗体 RIA 系について

精製  $\beta_2\mu$  の回収率は二抗体 RIA の測定値より約 18.8% と計算された。精製  $\beta_2\mu$  は免疫拡散法, 免疫電気泳動上抗  $\beta_2\mu$  血清とのみ単一の沈降線を形成しその泳動パターンは精製に使用された尿試料の沈降反応と同一で、単一沈降線を示した (図 1a)。なおこの場合精製  $\beta_2\mu$  は抗ヒト全血清, 抗ヒト尿蛋白血清, 抗 IgG 血清, 抗  $\kappa$ ,  $\lambda$  鎖血清とは反応を示さず、また RIA 系においても交叉反応を示さないことはさきに触れた。精製  $\beta_2\mu$  の Disc 電気泳動像は図 1b

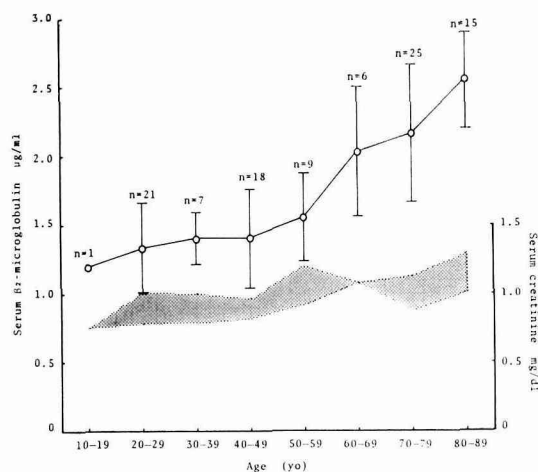


Fig. 6 Changes of serum  $\beta_2$ -microglobulin concentrations in ageing ( $M \pm SD$ ,  $n=102$ ). Serum samples were obtained from healthy control. The dotted area represented serum creatinine values. ( $M \pm SD$ ,  $n=83$ )

**Table 3** Urinary  $\beta_2$ -microglobulin ( $U\text{-}\beta_2\mu$ ) concentrations in spot urine specimens from healthy subjects ( $M \pm SD$ )

## 1) Adult group

Sex	Age years (mean)	Number of subjects	U- $\beta_2\mu$ $\mu\text{g/ml}$	U-TP <sup>¶</sup> $\text{mg/dl}$	Excretion ratio of U- $\beta_2\mu$ /U-TP (%)
Male	20-37 (26.9)	19	$0.06 \pm 0.05$	$5.4 \pm 4.8$	$0.24 \pm 0.23$
Female	23-58 (44.1)	12	$0.08 \pm 0.04$	$4.3 \pm 3.6$	$0.33 \pm 0.34$
Average for adult group					
	20-58 (33.6)	31	$0.07 \pm 0.04$	$4.9 \pm 4.4$	$0.28 \pm 0.28$

## 2) Aged group

Male	60-84 (73.7)	13	$0.36 \pm 0.74$	$4.3 \pm 3.1$	$0.93 \pm 1.28$
Female	70-87 (77.3)	16	$0.31 \pm 0.43$	$4.8 \pm 2.7$	$0.98 \pm 1.33$
Average for aged group					
	60-87 (75.7)	29	$0.33 \pm 0.59$	$4.6 \pm 2.9$	$0.96 \pm 1.31$

<sup>¶</sup> = urinary total protein

のごとくで、また SDS-polyacrylamide gel 電気泳動においても単一 band を示した。

$\beta_2\mu$  の分子量は Fig. 2のごとく約 11,000 と計算された。カラム等電点分析法では  $\beta_2\mu$  は pH 5.3 にピークを有する分画に溶出された。精製された  $\beta_2\mu$  のアミノ酸分析結果は Table 1のごとく、その数値は  $\beta_2\mu$  1分子あたりの各アミノ酸の残基数で表わされるが、Berggård ら<sup>3)</sup>、Ohsawa ら<sup>9)</sup> の報告とよく一致した。

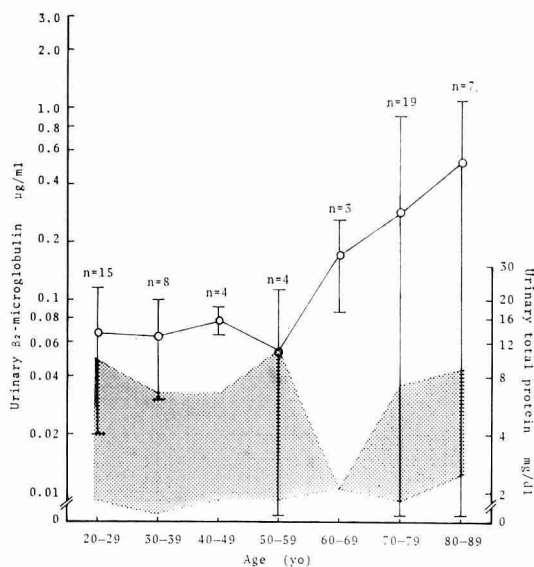
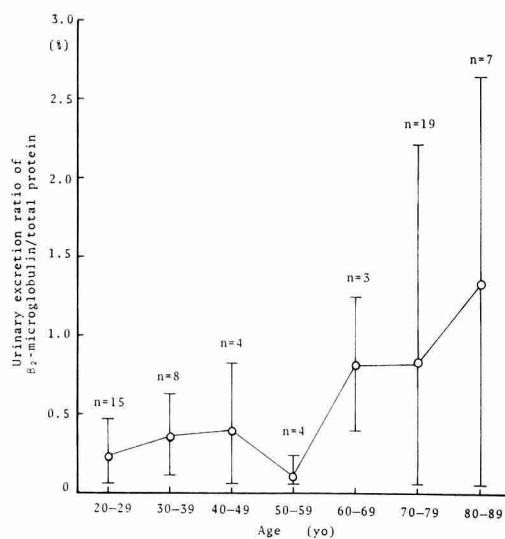
一方 これらを抗原として作製した抗血清との間に RIA 系を設定したが、そのさい自家製抗  $\beta_2\mu$  血清 (#NG 2) の

標準曲線は他の抗  $\beta_2\mu$  血清 (#055, #064) のそれと Fig. 3のごとくよく平行性を示した。また Fig. 4のごとく、この標準曲線は  $\beta_2\mu$  標準品に対して 5~20 ng/ml 間で直線関係を示した。

さらに同一検体をさきの二抗体 Mancini 法<sup>7)</sup> とこの RIA 法で測定して相関性をみたが、Fig. 5のごとく、極めて高い相関関係 ( $r=0.95$ ,  $p<0.01$ ) を得た。

2) 正常対照血清中の  $\beta_2\mu$  濃度ならびに尿中  $\beta_2\mu$  排泄量

Table 2に一括したが、60歳未満若年成人群、60歳以上を高齢者群に分けると、成人群の血清  $\beta_2\mu$  は  $1.40 \pm 0.33 \mu\text{g/ml}$  ( $M \pm SD$ ) で性差は認められず、高齢者群では  $2.28 \pm 0.49 \mu\text{g/ml}$  でやや男性で高い傾向を示す。

**Fig. 7** Changes of urinary excretion of  $\beta_2$ -microglobulin in spot urine specimens from healthy subjects in ageing. The dotted area represented urinary total protein values ( $M \pm SD$ ,  $n=60$ )**Fig. 8** Changes of urinary excretion ratio of  $\beta_2$ -microglobulin/total protein in spot urine from normal subjects in ageing ( $M \pm SD$ ,  $n=60$ )

**Table 4** Determinations of urinary excretion of  $\beta_2$ -microglobulin and total protein in patients with renal diseases

	$\beta_2$ -microglobulin $\mu\text{g/ml}$		U-TP mg/dl	Urinary excretion ratio of U- $\beta_2\mu$ /U-TP (%)	Serum creatinine mg/dl
	Serum	Urine			
Chronic glomerulo- nephritis					
M.N.	1.57	0.05	27.9	0.017	0.7
S.S.	13.33	6.08	17.6	3.456	8.1
M.A.	11.67	4.02	439.3	0.092	8.1
T.O.	26.67	0.40	235.5	0.017	11.1
Nephrotic syndrome					
K.N.	2.00	0.33	268.8	0.012	0.8
S.K.	1.25	0.22	220.9	0.010	0.6
Diabetic nephro- pathy					
Y.I.	4.17	3.00	322.1	0.093	1.5
Fanconi's syndrome					
N.F.	2.72	48.33	78.0	6.197	2.5
Polycystic kidneys					
T.S. <sup>†</sup>	5.58	21.67	21.0	10.318	2.1
G.O.	4.07	0.57	26.0	0.221	1.7

All tables were determined from detection in spot urine specimens.

U- $\beta_2\mu$  = Urinary  $\beta_2$ -microglobulin

U-TP = Urinary total protein

<sup>†</sup> = Unilaterally polycystic kidney

成人群と高年者群の血清  $\beta_2\mu$  の比較では、明らかに高年者群で増加を示し、その差は推計学上有意であった ( $p < 0.01$ ).

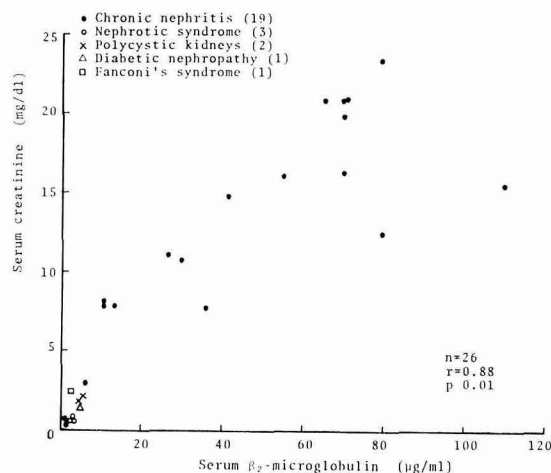
この成績の差異をさらに詳細に検討するため血清 Cr との関係において各年代別に統計をとり、加齢との関係を検討した。その結果は Fig. 6 のごとく、加齢とともに血清  $\beta_2\mu$  が次第に上昇する傾向がうかがわれ、両者の間には有意の正相関が認められた ( $r=0.74$ ,  $p<0.01$ )。また血清 Cr との関係では血清  $\beta_2\mu$  と血清 Cr の間には有意の正の相関が認められた ( $r=0.56$ ,  $p<0.01$ )。

念のため高年者群について高血圧症 (最高血圧 160 mm-Hg 以上, 最低血圧 95 mmHg 以上) を伴うものと伴わないものとに分けて血清  $\beta_2\mu$  を比較したが、高血圧群 23 例 (平均血圧 172/92 mmHg) の血清  $\beta_2\mu$  ( $2.37 \pm 0.43 \mu\text{g/ml}$ ) と非高血圧群 23 例のそれ ( $2.19 \pm 0.53 \mu\text{g/ml}$ ) との間には有意の差は見出されなかった。なお高血圧症を伴わない群 71 例における血清  $\beta_2\mu$  と血清 Cr との関係をみたが、その場合も正の相関 ( $r=0.39$ ,  $p<0.01$ ) を示したが、全対象者についての相関係数  $r=0.56$  よりもやや低値であった。

一方正常対照群の尿中  $\beta_2\mu$  は Table 3 のごとく、成人群では  $0.07 \pm 0.04 \mu\text{g/ml}$  で性差は認められない。高年者群では  $0.33 \pm 0.59 \mu\text{g/ml}$  でやや男性に高かった。なお高年者群のうち 2 例に尿中  $\beta_2\mu$  が  $1.3 \mu\text{g/ml}$  および  $2.9 \mu\text{g/ml}$  と著増する例が認められたが、諸検査の上では特に異常は

見出せなかった。

成人群と高年者群の尿中  $\beta_2\mu$  の比較では、高年者群が平均約 4~5 倍の割で成人群より排泄増加を示した。尿の総蛋白中に占める  $\beta_2\mu$  の排泄比を検討すると、成人群では  $0.28 \pm 0.28\%$  で、高年者群のそれは  $0.96 \pm 1.31\%$  と著増しており、尿蛋白量は成人群、高年者群共にほぼ差がみられないから、 $\beta_2\mu$  排泄比の差はおおよそ尿中  $\beta_2\mu$  の差に相当するものと考えられた。



**Fig. 9** Correlation of  $\beta_2$ -microglobulin concentrations with creatinine values in sera of patients with various renal diseases

尿中  $\beta_2\mu$  の加齢による推移を尿蛋白量との対比において検討し片対数グラフに図示した。Fig. 7のごとく 20~50 歳代の尿中  $\beta_2\mu$  はほぼ一定に推移するが、60 歳代から排泄増加がみられ、高年になるに従い著明であった。尿蛋白量と尿中  $\beta_2\mu$  の間には相関は認められないが、 $\beta_2\mu$  の排泄比を検討しても Fig. 8のごとく、同様の傾向が認められた。また  $\beta_2\mu$  排泄比と年齢との間にも正の相関を認めた ( $r=0.34$ ,  $p<0.05$ )。

尿試料より得られた成績も血清  $\beta_2\mu$  の加齢による推移と一致するが、しかし血清での成績に比較すると、その動揺が大きかった。対象となった成人群には高血圧症がみられないので高年者群における成績を血圧との関係において検討した。高血圧症を伴う高年者 18 例 (平均血圧 178/90 mmHg) の尿中  $\beta_2\mu$  は  $0.46 \pm 0.72 \mu\text{g/ml}$ , 尿蛋白量は  $5.1 \pm 2.9 \text{ mg/dl}$ ,  $\beta_2\mu$  排泄比は  $1.27 \pm 1.54\%$  と変動の幅が大きい、一方高血圧症を伴わない 11 例はそれぞれ  $0.12 \pm 0.07$

$\mu\text{g/ml}$ ,  $3.7 \pm 2.7 \text{ mg/dl}$  および  $0.46 \pm 0.44\%$ , といずれも高血圧症群に高く、ことに尿中  $\beta_2\mu$  と  $\beta_2\mu$  排泄比については約 3~4 倍の増加を示し、血圧の影響が示唆された。

### 3) 腎疾患ならびに他の病態における血清 $\beta_2\mu$ および尿中 $\beta_2\mu$ に関する成績

腎疾患における成績を Table 4 に一括してまとめた。慢性腎炎では血清  $\beta_2\mu$  が著しく増加する例を認め、これらは血清 Cr も増加する。尿中  $\beta_2\mu$  は変動が大きく、 $\beta_2\mu$  排泄比は 1 例 (S.S.) を除いてはむしろ正常対照群の成績よりも低値を示した。ネフローゼ症候群では血清・尿中  $\beta_2\mu$  と正常対照群との間に変化を示さないが、 $\beta_2\mu$  排泄比は低値であった。尿細管性蛋白尿を示す Fanconi 症候群や多発性嚢胞腎症例では血清  $\beta_2\mu$  に比して尿中  $\beta_2\mu$  の著しい増加を示す点が特徴的であった。Fanconi 症候群の 24 時間尿中  $\beta_2\mu$  排泄量は 99 mg に達した。

血清  $\beta_2\mu$  と血清 Cr の間には Fig. 9 に示すごとく、明ら

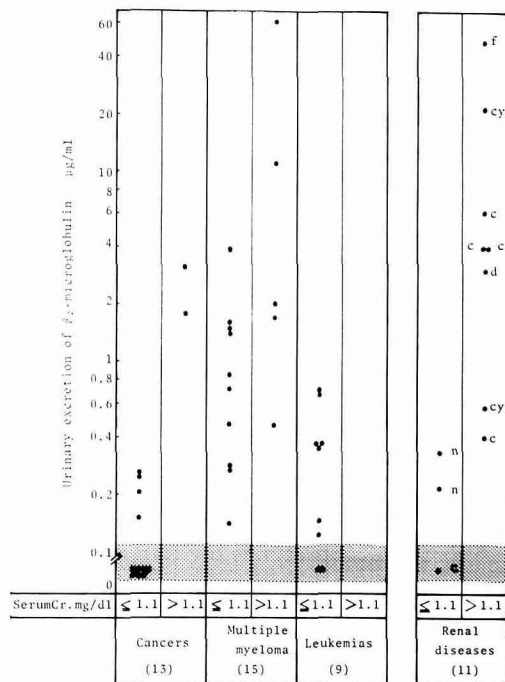


Fig. 10 Urinary excretion of  $\beta_2$ -microglobulin in spot urine specimens from patients with various diseases

- f. Fanconi's syndrome.
- cy. Polycystic kidneys.
- c. Chronic nephritis.
- d. Diabetic nephropathy.
- n. Nephrotic syndrome.

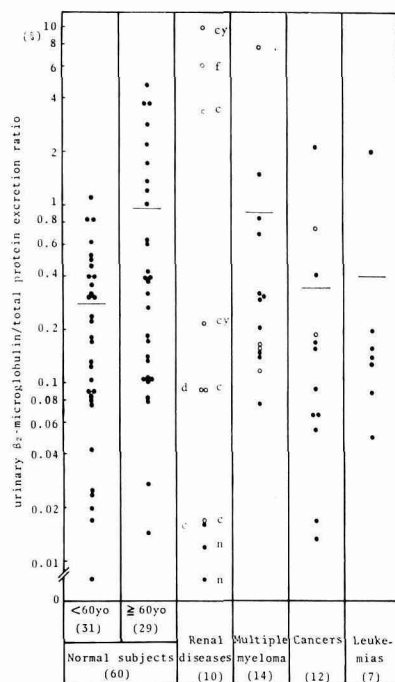


Fig. 11 Urinary  $\beta_2$ -microglobulin/total protein excretion ratio in the spot urines of normal subjects and of patients with various diseases

(○: case with abnormal serum creatinine values)

- f. Fanconi's syndrome.
- cy. Polycystic kidneys.
- c. Chronic nephritis.
- d. Diabetic nephropathy.
- n. Nephrotic syndrome.



かな相関がみられた ( $r=0.88$ ,  $p<0.01$ ). このうち血液透析療法をうけている腎不全例の血清  $\beta_2\mu$  は著しく高濃度で、正常対照平均の約 82 倍に達する最高値  $11.5 \text{ mg/dl}$  を示した。血清 Cr が  $10 \text{ mg/dl}$  を越える症例は大部分、透析治療例ゆえ明らかに血清 Cr の上昇に比較して血清  $\beta_2\mu$  の増加の方が著しい。

多発性骨髄腫および各種癌等においても血清  $\beta_2\mu$  の増加がみられた。これを腎疾患と対比して Fig. 10 に示したが、この場合正常域は対照成人 31 例の測定値 ( $M \pm SD$ ) で表現してある。悪性腫瘍では血清 Cr の正常例においても尿中  $\beta_2\mu$  の増量がみられ、ことに多発性骨髄腫で著明であった。むしろ血清 Cr が上昇すると、 $\beta_2\mu$  も著しく増加する傾向がうかがわれた。

これらの疾患群における  $\beta_2\mu$  排泄比を Fig. 11 に正常対照群と対比してまとめた。尿細管性蛋白尿を示す Fanconi 症候群や多発性嚢胞腎症の場合と糸球体性蛋白尿を示すネフローゼ症候群とは対照的な相違を示し、正常対照、各種悪性腫瘍群はほとんどがこの両者の中間に分布する。なお対照成人群と高年者群の比較では、後者の方が高く、尿細管性腎疾患のそれに近かった。

腎疾患群では血清 Cr の異常高値を伴う例が全例  $\beta_2\mu$  排泄比の上で増加を示した。多発性骨髄腫では多量の蛋白尿 ( $6.7 \sim 653.3 \text{ mg/dl}$ ) を伴う例が多いが、 $\beta_2\mu$  排泄比は尿細管性腎疾患に近く、対照高年者群と同程度を示した。癌や白血病でも尿蛋白量の増加 (それぞれ  $5.7 \sim 48.7 \text{ mg/dl}$ ,  $3.3 \sim 42.9 \text{ mg/dl}$ ) がみられたが、 $\beta_2\mu$  排泄比は正常対照群

とほぼ同程度であった。これらの悪性腫瘍群は血清 Cr と  $\beta_2\mu$  排泄比との間に腎疾患の様な一定の関係を示さない。

#### 4) 腎組織の蛍光抗体法による観察成績

間接蛍光抗体法により腎尿細管上皮内に  $\beta_2\mu$  の沈着を観察した。阻止試験によって蛍光は著しく減弱ないし消失するところから、その特異性が確認された。多発性骨髄腫の腎においては Fig. 12 のごとく強い蛍光が観察された。すなわち特異蛍光はび慢性に腎尿細管上皮内にみられ、顆粒状を呈する。この様な蛍光は血管壁あるいは尿細管上皮以外の間質においては観察されなかった。糸球体は大部分が陰性であったが、中に小斑点状に蛍光を発する所が見られ、技術上の誤りか否かを見極めるまでにいたらなかった。しかし個々の尿細管においても強く染まるものと、全く染まらない 2 種のタイプがみられ、それは隣り合った尿細管の間にもみられた。この傾向は検索し得た 2 症例において全く同様に観察された。

#### 考 按

1968 年、Berggård ら<sup>3)</sup> によって  $\beta_2\mu$  が尿細管性蛋白尿から分離精製されて以来、諸家によるその精製の試みが続けられた。今回著者はさきの<sup>7)</sup> 抽出に続き、Fanconi 症候群患者尿から、方法的に比較的容易な Bernier<sup>8)</sup> および Ohsawa ら<sup>9)</sup> の手順で  $\beta_2\mu$  の分離精製を行ない、その性質の分析を行なった。その結果分子量は約 11,000 と計算されたが、この数値は Berggård ら<sup>3)</sup> の平衡超遠心法による 11,600、アミノ酸残基数からの計算値 11,815 にほぼ一致する。またその等電点は 5.3 で、斎藤<sup>15)</sup> の 5.6 にやや近い。単離した  $\beta_2\mu$  のアミノ酸組成においても Berggård<sup>3)</sup>, Ohsawa ら<sup>9)</sup> の成績によく一致を示した。これは免疫電気泳動、免疫拡散法による分析上抗原的に単一成分を示し、ほぼ均一な蛋白質としての抽出に成功したものと考えられる。

これまで知られたところでは、 $\beta_2\mu$  は 100 個のアミノ酸残基から成る単一ポリペプチドで、鎖内には 1 個の S-S 結合で結ばれたアミノ酸の loop をもち、沈降係数は  $S_{20,w} = 1.6 S$  で<sup>3)</sup>、球状の粒子を呈し、stoke's radius は  $16 \text{ \AA}$  と報告されている<sup>16)</sup>。 $\beta_2\mu$  のアミノ酸配列が決定され、 $\beta_2\mu$  の一次構造が明らかになるに従い、免疫グロブリンの一部、ことに EU IgG<sub>1</sub> の CH<sub>3</sub> との著しい類似性が発見されて<sup>17)</sup>、Peterson ら<sup>18)</sup> は、この点に着目して“free immunoglobulin domain”なる概念を提唱し、免疫グロブリンとの関係が注目された。しかしこれまでは共通抗原性は証明されていない。

また白血球組織適合抗原 (HL-A) を papain 消化すると、分子量 48,000 と 11,000 の不変部の 2 つの fragment に分かれるが、小さい fragment が  $\beta_2\mu$  と一致するとも報

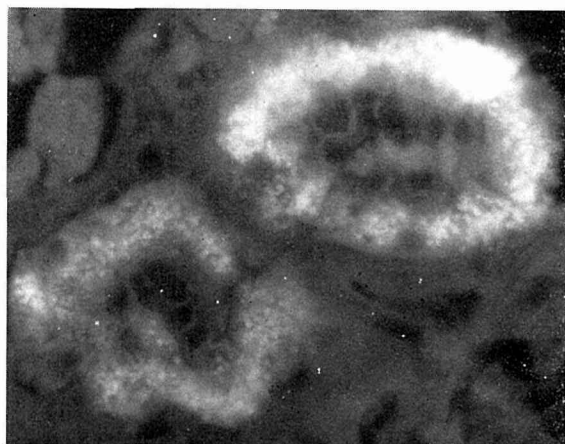


Fig. 12 Depositions of  $\beta_2$ -microglobulin in the tubular epithelium of the kidney

Sections labeled with rabbit anti- $\beta_2$ -microglobulin serum (Dakopatts #055) and FITC-conjugated goat anti-rabbit IgG; granular labelling of  $\beta_2$ -microglobulin ( $\times 400$ ).

A case (K. S., 73 yrs, male) of IgA ( $\kappa$ ) MM).

告された<sup>19)</sup>。このポリペプチドは分子量、電気的易動度、等電点およびアミノ酸組成が $\beta_2\mu$ のそれらと一致し<sup>19)</sup>、抗原性においても $\beta_2\mu$ と差がみられないことから<sup>20)</sup>、現在では $\beta_2\mu$ はHL-A抗原のsubunitであろうと考えられている<sup>21)</sup>。ここに $\beta_2\mu$ が免疫学的な注目を集めるにいたった理由がある。

一方 $\beta_2\mu$ はリンパ球をはじめ有核細胞の細胞表面に存在すると共に、そこで産生され<sup>10,22)</sup>、正常血清中にも微量に存在して腎で異化される<sup>4,8)</sup>。すでに腎は血漿蛋白の代謝に関連する重要な器管とされているが、その機構は蛋白粒子の糸球体透過性と近位尿細管細胞での蛋白再吸収能、および細胞内代謝と代謝産物の転送から成るものとされている<sup>1,23)</sup>。糸球体の透過性は主として蛋白質の分子量の大きさによって左右されるから、M.W. 6万以上の high molecular weight 蛋白 (HMW-蛋白) や albumin 等の intermediate molecular weight 蛋白 (IMW-蛋白) は糸球体壁で sieving され、大部分は透過されずに血漿中にとどまるが、分子量5万以下の LMW-蛋白は直ちに濾過される。しかし糸球体壁の pore size 80 Å よりも小さい、stoke's radius 35 Å の albumin 分子が正常では容易に透過されない様に、糸球体の透過性にあずかる因子はかなり複雑で、メザンギウム細胞<sup>24)</sup>や分子の大きさ、あるいは糸球体濾過率 (GFR) ばかりでなく、pore size、蛋白粒子の形状、電気的 charge、蛋白質の結合性など多くの因子がそこに関与するものと考えられている<sup>1,23)</sup>。

一方近位尿細管細胞からは再吸収機序による取り込みが行なわれるし、これらの蛋白質が腎で代謝をうける過程は micropuncture 法<sup>25)</sup>、アイソトープ標識蛋白の使用<sup>26)</sup>、horseradish peroxidase<sup>27)</sup>を用いる形態学的研究などによって次第に明らかにされ、こんにちではそこでの細胞内代謝器管が lysosome であることも明らかにされてきた。またここでの蛋白代謝速度は蛋白分子の大きさによっても左右されるが、Waldmann ら<sup>28)</sup>は IMW-蛋白である IgG と、LMW-蛋白である  $\lambda$ -L 鎖を用いた turn-over 法により、 $\lambda$ -L 鎖の血中からの消失速度は IgG のそれよりも約 100 倍も速いことを明らかにした。この場合  $\lambda$ -L 鎖の 99% は異化されるが尿中への排泄はわずかに 1% に過ぎないことも明らかにされている。つまり正常では近位尿細管細胞の蛋白再吸収能は極めて効率がよく、Heinemann<sup>1)</sup>は糸球体を透過した蛋白の 95% は再吸収されると推定しており、尿蛋白として検出される量は極めて少ない。したがって腎尿細管による血漿成分の調節機構は、LMW-蛋白代謝に関しては特に重要な役割を果している<sup>1,23)</sup>。

ところで正常人でも微量の蛋白は尿中に検出されるが、1日量が 150 mg を越える場合には異常と言える<sup>1,29)</sup>。今

回の研究では、spot 尿で正常対照例の尿蛋白量は 15 mg/dl 以下と定めたが、多くは 4-5 mg/dl であった。上田ら<sup>30)</sup>も正常人の尿蛋白量は 10-20 mg/dl を越えるものではないと述べているが、spot 尿で評価する限りこの変動の幅はかなり大きいものと考えられる。また正常人の尿蛋白は約 60% が血漿由来のもので、albumin を主体とした比較的分子量の小さい蛋白である<sup>31)</sup>。種々の腎障害ではその病態に応じて尿蛋白量の増加とその組成の変化がみられるが、尿細管障害時の尿蛋白量は多くなく、糸球体障害を合併しない限り一日排泄量は 1 g 以下とされる<sup>32)</sup>。その場合分子量 5 万以下の LMW-蛋白が 35-44% を占めて糸球体障害時の蛋白尿の主体である albumin は 20-30% 位に過ぎず、糸球体障害時に比較して明らかに異なる<sup>32)</sup>。この尿蛋白組成の特徴は、Waldmann ら<sup>23)</sup>が指摘した様に尿細管障害性腎疾患においても糸球体透過性は正常とあまり変りがなく、近位尿細管蛋白異化能の低下によって LMW-蛋白が大量に排泄されるものと説明されている。これらの尿蛋白には免疫電気泳動上は 30 種の成分が検出され<sup>23)</sup>、その中でも量的に重要な LMW-蛋白として  $\beta_2\mu$ <sup>3)</sup>、リゾチーム<sup>33)</sup>、L 鎖<sup>28,34)</sup>、retinol binding protein<sup>35)</sup>、インスリン等<sup>23)</sup>があげられる。これらの LMW-蛋白は正常血漿中にも微量に存在する成分であるから、尿細管障害時の LMW-蛋白の大量排泄は尿細管細胞による異常分泌の結果ではなく、近位尿細管の蛋白再吸収能と異化能の低下、すなわち renal handling の破たんによるものと考えられている<sup>23)</sup>。尿細管性蛋白尿を示す疾患には Fanconi 症候群<sup>2)</sup>、チステン尿症、慢性カドミウム中毒<sup>5)</sup>、移植腎<sup>36)</sup>、Wilson 病<sup>2)</sup>、骨髄腫腎<sup>37)</sup>、ガラクトーゼ血症<sup>2)</sup>、急性尿細管壊死<sup>33)</sup>、Lowe 症候群<sup>32)</sup>などが知られているが、これらの疾患では先に述べた様に LMW-蛋白の尿中排泄増加を伴う。中でも  $\beta_2\mu$ は排泄量の多いことや、尿細管障害型と糸球体障害型などの鑑別に有用であるということから注目されている<sup>4,38,39)</sup>。

血清あるいは尿試料の  $\beta_2\mu$  測定には通常 RIA 法が用いられている。今回用いた二抗体 RIA 法では 2 ng/ml までの  $\beta_2\mu$  測定が可能で、再現性もよく、固相法による RIA<sup>40)</sup>に比べてもそんな色を認めなかった。また尿の pH の調整は重要で、前後 pH 7 前後では -20°C 保存で  $\beta_2\mu$  は 4 週間は安定であるが、pH 5.5 以下では 37°C 2 時間で変性する<sup>41)</sup>。今回の対象の中には尿  $\beta_2\mu$  濃度が 10 ng/ml 以下を示した検体が 3 例あり、尿中  $\beta_2\mu$  の変性も考えられたが、再検の結果では測定値に変化を認めなかった。

以上の文献的事実を念頭にして今回の成績を考察すると、60 歳未満の正常対照群の血清  $\beta_2\mu$  は  $1.40 \pm 0.33 \mu\text{g/ml}$  ( $M \pm SD$ ) であり、この測定値は河合ら<sup>42)</sup>の成績 (男子 1.08

$\pm 0.45$ , 女子  $1.00 \pm 0.42$  mg/l) よりやや高く, Evrin ら<sup>41)</sup>の報告値  $1.6$   $\mu$ g/ml に近い. この理由として測定法の異なることもむろん関係するが, 正常対照群の選び方にも年齢差の上で考慮の余地がある. 河合らはより若年者にしぼっているし, 一方 Evrin らは 76 歳までの高年者までを対象としている. 著者がこれを高年者群と一般成人群別に分けて調べた成績では, 60 歳以上の対照群は一般成人群のそれよりも明らかに高値で, 血清  $\beta_2\mu$  は加齢と共に増加することが明らかにされた. 同時にこの数値は血清 Cr と相関することを認めた. この理由の 1 つとしてさらに高血圧との関係をみたが, 今回の成績では高血圧症の影響を積極的に明らかにするまでにはいたらなかった. Wibell ら<sup>38)</sup>は GFR の低下した症例では, 血清 Cr よりも  $\beta_2\mu$  の方が GFR の指標になり得ると述べているが, 高年者では一般に腎機能が全般的に低下するとされ, 特に Shock ら<sup>43)</sup>は合併症のない腎健常者の GFR を調べて, RBF と共に 40 歳を越えると次第に低下して, 60~80 歳代では 20~40 歳代に比較して 46% も減少していると述べ, また浅野<sup>44)</sup>は 50 歳以後においては機能している糸球体は若年者の 74% 前後ではなからうか, と推定している. 高年者の高  $\beta_2\mu$  血症成立には, おそらくは GFR の低下が関与するものと考えられるが, 今後検討を要するところである.

この点加齢に伴って血清  $\beta_2\mu$  は血清 Cr と相関して増加したが, これは腎疾患の場合でも同じ傾向であり, 加齢による GFR の低下を暗示するとも言えるかも知れない. 血清 Cr は体構成筋肉量の多少によって影響されるから, 比較的筋肉の少ない高年者では血清 Cr よりも  $\beta_2\mu$  の方が GFR の指標になりうるという考えは妥当かも知れない.

また高年者の血清  $\beta_2\mu$  増加に関連して, すでに知られている胎児の高  $\beta_2\mu$  血症を考えると, これは胎児体内での  $\beta_2\mu$  産生亢進によるとされているが<sup>45)</sup>, 高年者では血清蛋白成分の多くが減少する傾向にあるから, むしろ対照的な現象と言える. 高年者についても  $\beta_2\mu$  産生亢進の可能性は否定できない.

正常人の尿中  $\beta_2\mu$  は Peterson ら<sup>4)</sup>は  $0.06 \sim 0.21$  mg/日, Evrin ら<sup>41)</sup>は平均  $75 \sim 78$   $\mu$ g/日, 河合ら<sup>39)</sup>は  $31.5 \sim 100$   $\mu$ g/日と報告しており, いずれも大差はみられない. 今回は尿中  $\beta_2\mu$  は 60 歳未満の成人群で  $0.07 \pm 0.04$   $\mu$ g/ml と測定されたが, spot 尿における測定値であるから, これら諸家の報告値と比較することはできない. しかし成人の 1 日排尿量を  $1 \sim 2$  l とすると,  $70 \sim 140$   $\mu$ g/日と推定され, 尿中  $\beta_2\mu$  の日内変動を含めてさらに検討の必要もあるが, ほぼ妥当な測定値と考えられる.

尿中  $\beta_2\mu$  および  $\beta_2\mu$  排泄比は加齢に伴って増加の傾向がみられ, 高年者では著しく高濃度であったが, しかし,

血清  $\beta_2\mu$  の場合と異なり, この場合は高年者において血圧の影響が顕著にみられた. すなわち, 軽度の高血圧を伴う高年者の尿中  $\beta_2\mu$  は  $0.46 \pm 0.72$   $\mu$ g/ml と高濃度で, 非高血圧症群に比較して, 一見アンバランスな  $\beta_2\mu$  排泄比の増加を示すが, この様な例では尿細管機能低下が加味されているものと推定される. 高年者では RBF や GFR の低下にはほぼ比例して全般的な尿細管機能低下が考えられており, Shock ら<sup>43)</sup>は diodrast 排泄極量を検討した結果, 近位尿細管の排泄能は 90 歳で若年者に比し 44% 減少し, またブドー糖の再吸収能も低下していると述べている.

この様な高年者における腎機能の低下を Shock ら<sup>43)</sup>は加齢に伴うネフロン減少によると説明し, 病因論的には腎動脈硬化による腎の虚血性変化ないし萎縮と考えられており<sup>46)</sup>, 井上<sup>47)</sup>は腎動脈硬化による糸球体の虚血性変化はネフロン全体の機能に影響を与えるが, 尿細管部では近位尿細管の混濁膨脹や拡張をみた後, 次第に萎縮していくが, 糸球体の変化が軽度でも尿細管の変化の強度の場合がみられ, 尿細管は糸球体に比較して虚血の影響を受けやすいと述べている. Friedman ら<sup>48)</sup>は尿細管に特異的にとり込まれる  $^{197}\text{Hg}$ -chlormerodrin を用いて健常高年者の腎スキャン像を検討し, 71% に異常スキャン像を, 46% に腎内部分欠損像を見出して, この様な欠損像は尿細管の虚血性変化によるものであり, その領域では尿細管機能の低下を示していると述べている.

以上より高年者腎では加齢に伴う機能ネフロン減少によって予備力が次第に低下し, 潜在的な腎機能障害の状態にあると考えられるが, 血圧の上昇や細動脈性腎硬化が加味されるところによって一層と腎内虚血傾向が著明となり, 尿細管機能障害が顕在化してくるものと推測される. 今回の成績では高年者の中に大量の  $\beta_2\mu$  を尿中に排泄する例もみられたが, 高年者の尿細管機能を尿中 LMW-蛋白の分析の面から検討を加えることは十分意義があるものと考ええる.

今回の知見では, さらに腎疾患において血清  $\beta_2\mu$  と血清 Cr がほぼ平行して増加を示したが, これは Peterson ら<sup>4)</sup>が示した様に,  $\beta_2\mu$  とクレアチニンとは腎において同じ扱いを受けることを示すものであろう. しかし血清  $\beta_2\mu$  の上昇はクレアチニンのそれよりも著しく, この理由としては河合ら<sup>39)</sup>はクレアチニンは主として GFR を反映し, ごく一部, 腎からの排泄が関与するのに対し,  $\beta_2\mu$  は GFR の減少と異化の減少との両者が関与するためによるものと説明している. 腎障害の諸相を吟味した成績をみると, その初期には血清  $\beta_2\mu$  は血清 Cr よりも早期に増加し<sup>49,50)</sup>, また逆に回復期ではより早く低下すると言われ<sup>51)</sup>, この点からも  $\beta_2\mu$  が腎機能を鋭敏に反映することが示唆される. 今

回は加齢に伴って腎機能低下傾向がみられる場合にも、腎疾患に限らず  $\beta_2\mu$  とクレアチニンは相関して増加を示したが、これは血清  $\beta_2\mu$  の増量を示す多発性骨髄腫や悪性腫瘍の場合にもあてはまることである<sup>52)</sup>。種々の病態の違いにおいても  $\beta_2\mu$  とクレアチニンは同じような renal handling をうけているものと考えられる。

一方蛋白尿が糸球体・尿細管のいずれに由来するか、その鑑別に関しては、以上の考え方を総合すると尿総蛋白中に占める  $\beta_2\mu$  の割合を指標とすることが出来、さらに糸球体と尿細管のバランスが尿中 albumin と  $\beta_2\mu$  の比によって推定可能と言える。これは Peterson ら<sup>4)</sup> によって唱導された点で各種腎疾患の尿中 albumin と  $\beta_2\mu$  を定量してその比率を検討することによって蛋白尿の成因が糸球体障害型か尿細管障害型か、または混合型であるかの鑑別を明らかにした。

今回の成績では、この点を支持するかのごとく、尿細管障害を示す Fanconi 症候群では尿中  $\beta_2\mu$  は著しく高濃度で、尿総蛋白中に占める  $\beta_2\mu$  の割合も著増を示した。一方糸球体障害型のネフローゼ症候群の  $\beta_2\mu$  排泄比はむしろ腎健常者のそれよりも低値であった。慢性腎炎でネフローゼ加味の型の場合には  $\beta_2\mu$  排泄比はネフローゼ症候群同様低値であるが、血清  $\beta_2\mu$  の増量を伴う点で明らかに相違する。

一般に糸球体腎炎では当初糸球体性蛋白尿を示すが、腎障害の進行につれて尿細管性因子が優位の型に移行するとわれ、頼岡ら<sup>50)</sup> は慢性血液透析患者の尿中  $\beta_2\mu$  は正常人に比べて約 100~1,000 倍以上に増加すると述べている。Bernier<sup>8,49)</sup>、Peterson ら<sup>4)</sup> が示した様に  $\beta_2\mu$  は腎でそのほとんどが異化されると考えられるから、正常人の尿中へ排泄される  $\beta_2\mu$  は糸球体を透過した量の約 1/3,000 と推定され<sup>41)</sup>、腎障害における尿中  $\beta_2\mu$  は尿細管機能低下の程度をおおよそ反映しているものと考えられる。

悪性腫瘍患者の尿中  $\beta_2\mu$  に関する報告はほとんどみられないが、今回の成績では増量していることが認められた。血清 Cr 異常例ではその増量はより著しくなったが、これはさきにも触れたようにこれらの悪性腫瘍においても、腎疾患の場合と同様に血清  $\beta_2\mu$  が血清 Cr とよく相関して増加する成績<sup>52)</sup> に関係しているのかも知れない。

悪性腫瘍の中でも多発性骨髄腫では尿中  $\beta_2\mu$  は著しく増加し、その尿中  $\beta_2\mu$  排泄比はむしろ尿細管性腎疾患のそれに近い。Harrison ら<sup>37)</sup> によれば、多発性骨髄腫の中には尿細管性蛋白尿を示す例も報告され、今回の多発性骨髄腫における尿中  $\beta_2\mu$  の増加は、上述の  $\beta_2\mu$  に関する知見と照らし合わせると、少なくとも部分的には尿細管障害が関与することを示唆する。しかし多発性骨髄腫以外の白血

病や各種癌の症例では尿中  $\beta_2\mu$  の増加はそれほど著しいわけではなく、 $\beta_2\mu$  排泄比はむしろ腎健常者のそれとほぼ等しく、これらの疾患においては尿細管障害の関与を積極的に明らかにするまでにはいたっていない。

多発性骨髄腫や各種癌では、血清  $\beta_2\mu$  が異常高値を示す例がみられ、その由因はそれらの産生亢進のためとも考えられているが<sup>45,52)</sup>、悪性腫瘍における尿中  $\beta_2\mu$  の増加は血清  $\beta_2\mu$  の増量がある程度反映する結果とも考えられ、同時にそれは尿細管機能障害の程度によっても修飾されているものと言えるかも知れない。

以上血漿蛋白の renal handling の観点から、各種病態における  $\beta_2\mu$  の代謝について述べたが、その代謝経路の詳細については推測の域を出ない。Bernier ら<sup>8)</sup> の仮説によれば、(1) 尿細管障害型の疾患では、 $\beta_2\mu$  など LMW-蛋白が大量に尿中に排泄されることから、糸球体を透過した LMW-蛋白の再吸収能障害が考えられる。(2) 尿管結紮を施して GFR を減少させても  $\beta_2\mu$  の異化率は変わらないから peritubular capillary network を経由して蛋白粒子が尿細管細胞にとり込まれ、異化作用をうけるであろう。したがって尿細管障害は細胞内異化能の低下による、との考えである。

Fermin ら<sup>51)</sup> は腎移植患者において  $\beta_2\mu$  や  $\lambda$  鎖の血清濃度の低下が排尿が起こる前に観察されたことにより、Bernier らの第 2 の考えを支持し、頼岡ら<sup>50)</sup> は慢性糸球体腎炎軽症例において、尿中  $\beta_2\mu$  の増加がほとんどみられないにもかかわらず、血中  $\beta_2\mu$  はすでに全例に増加が認められることより、尿細管における再吸収能よりもむしろ尿細管上皮における分解代謝能の方が早期に障害されよう、と推定している。

ところで、今回蛍光抗体法によって観察したところでは、 $\beta_2\mu$  の尿細管上皮内沈着が認められ、 $\beta_2\mu$  の腎における代謝器官が尿細管であることを十分に推測することが出来た。この所見は頼岡ら<sup>53)</sup> のいう  $\beta_2\mu$  の上皮内蓄積に相当するものと考えられるが、これが過剰のとり込みによる  $\beta_2\mu$  の飽和を意味するか、上皮内異化能低下による  $\beta_2\mu$  の分解遷延を意味しているかについては、なお明らかにすることは出来なかった。尿細管の中にも  $\beta_2\mu$  の蛍光を認める部分と、陰性の部分がみられ、前者はほぼ近位尿細管に相当するものと推定されたが、今後の解明に待たねばならない。

## 結 論

尿細管性蛋白尿から低分子蛋白  $\beta_2$ -microglobulin ( $\beta_2\mu$ ) を分離し、その免疫化学的性状について検討した。さらに健常者および種々の腎障害を示す患者血清、尿中  $\beta_2\mu$  を

radioimmunoassay により測定し、以下の結論を得た。

1) 血清  $\beta_2\mu$  の平均値は 60 歳未満の健常者で  $1.40 \mu\text{g/ml}$  であったが、60 歳以上の高年者では  $2.28 \mu\text{g/ml}$  と増加した。男女差はない。検索した高年者の約半数に軽症高血圧を認めたが、血清  $\beta_2\mu$  への明らかな影響は認められなかった。血清  $\beta_2\mu$  は加齢とともに増加する傾向があり、有意な相関を示した。また血清  $\beta_2\mu$  と血清 Cr の間に相関がみられた。高年者の比較的高い血清  $\beta_2\mu$  値は糸球体濾過率の低下に関連することが推測された。

2) Spot 尿で測定された尿中  $\beta_2\mu$  および尿総蛋白中に占める  $\beta_2\mu$  の排泄比の平均値は、60 歳未満の健常者でそれぞれ  $0.07 \mu\text{g/ml}$ ,  $0.28\%$  であった。これらの値は高年者ではかなり増加していた。高年者の尿中  $\beta_2\mu$ ,  $\beta_2\mu$  排泄比には軽症高血圧の影響が明らかに認められた。若年成人と高年者の尿蛋白量に差はみられない。加齢が尿細管機能低下に影響することが示唆された。

3) 腎疾患では spot 尿における  $\beta_2\mu$ ,  $\beta_2\mu$  排泄比を定量することは尿細管性蛋白尿の検索に有用であるものと推測された。

4) 多発性骨髄腫やその他の悪性腫瘍でも明らかに尿中  $\beta_2\mu$  の増加がみられた。その増加はある程度悪性腫瘍での血清  $\beta_2\mu$  の増量を反映するものと推測された。

5) 蛍光抗体法により腎尿細管上皮内の  $\beta_2\mu$  沈着が証明され、腎における  $\beta_2\mu$  の代謝部位として尿細管との関係を論じた。

## 謝 辞

稿を終えるに臨み、本研究の指導・協力の各方面にわたり支持を与えられた内科学第 1 講座谷内 昭助教授、川原田信博士はじめ教室各位、および慈啓会病院長浦沢喜一博士をはじめ北海道老年医学研究施設関係各位に深謝する。また  $\beta_2$ -microglobulin のアミノ酸分析について、北海道大学薬学部石井信一教授、藤本三枝子嬢、さらに腎不全患者血清・尿試料の供与に対し、佐藤皮膚泌尿器科佐藤業連博士の御協力に謝意を表したい。

本研究の一部は北海道老年医学研究振興会研究費によった。

(昭和 52. 2. 17 受付)

## 文 献

- Heinemann, H. O., Maack, T. M. and Sherman, R. L.: Proteinuria. *Amer. J. Med.* **56**, 71-82 (1974).
- Butler, E. A. and Flynn, F. V.: The proteinuria of renal tubular disorders. *Lancet* **2**, 978-980 (1958).
- Berggård, I. and Bearn, A. G.: Isolation and properties of a low molecular weight  $\beta_2$ -globulin occurring in human biological fluids. *J. Biol. Chem.* **243**, 4095-4103 (1968).
- Peterson, P. A., Evrin, P. E. and Berggård, I.: Differentiation of glomerular, tubular, and normal proteinuria: determinations of urinary excretion of  $\beta_2$ -microglobulin, albumin, and total protein. *J. Clin. Invest.* **48**, 1189-1198 (1969).
- 野見山一生: カドミウム中毒における腎障害と蛋白尿 (続). *医学のあゆみ* **83**, 121-129 (1972).
- 木村正巳: 生体障害の検出法. 血清・尿蛋白. *総合臨牀* **23**, 107-116 (1974).
- 西岡文彦, 谷内 昭, 和田武雄: 血清  $\beta_2$ -microglobulin の二抗体放射状免疫拡散法による測定と腎疾患における知見. *医学のあゆみ* **96**, 116-117 (1976).
- Bernier, G. M. and Conrad, M. E.: Catabolism of human  $\beta_2$ -microglobulin by the rat kidney. *Amer. J. Physiol.* **217**, 1359-1362 (1969).
- Ohsawa, M. and Kimura, M.: Isolation of  $\beta_2$ -microglobulin from the urine of patients with Itai-Itai (Ouch-Ouch) disease. *Experientia* **29**, 556-558 (1973).
- Fanger, M. E. and Bernier, G. M.: Subpopulations of human lymphocytes defined by  $\beta_2$ -microglobulin. *J. Immunol.* **111**, 609-617 (1973).
- Davis, B. J.: Disc electrophoresis-II. Method and application to human serum proteins. *Ann. New York Acad. Sci.* **121**, 404-427 (1964).
- 林 健志: SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法. 右田俊介編: 免疫実験操作法, 1973 年増補版, 615-620, 日本免疫学会, 金沢 (1973).
- Vesterberg, O. and Svensson, H.: Isoelectric fractionation, analysis, and Characterization of ampholytes in natural pH gradients. IV. Further studies on the resolving power in connection with separation of myoglobins. *Acta Chem. Scand.* **20**, 820-834 (1966).
- Hunter, W. M.: Radioimmunoassay: Weir, D. M.: Handbook of experimental immunology second edition vol. 1, Immunochemistry, cap. 17, 14-16, Blackwell Scientific publications, Oxford, London, Edinburgh, Melbourne (1973).
- 鈴木隆城, 佐々木 毅, 佐藤 功, 大滝正通, 斎藤 寛, 塩路隆治, 小野寺清寿, 助野典義:  $\beta_2$ -microglobulin の分離精製と各種疾患の尿中  $\beta_2$ -microglobulin, retinol-binding protein の検討. *医学のあゆみ* **96**, 451-452 (1976).
- Karlsson, F. A.: Physical-chemical properties of  $\beta_2$ -microglobulin. *Immunochemistry* **11**, 111-114



- (1974).
- 17) Cunningham, B. A., Wang, J. L., Berggård, I. and Peterson, P. A.: The complete amino-acid sequence of  $\beta_2$ -microglobulin. *Biochemistry* **12**, 4811-4822 (1973).
  - 18) Peterson, P. A., Cunningham, B. A., Berggård, I. and Edelman, G. M.:  $\beta_2$ -microglobulin—A free immunoglobulin domain (light and heavy chain/ amino-acid sequence). *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **69**, 1697-1701 (1972).
  - 19) Nakamuro, K., Tanigaki, N. and Pressman, D.: Multiple common properties of human  $\beta_2$ -microglobulin and the common portion fragment derived from HL-A antigen molecules. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **70**, 2863-2865 (1973).
  - 20) Grey, H. M., Kubo, R. T., Colon, S. M., Poulik, M. D., Cresswell, P., Springer, T., Turner, M. and Strominger, J. L.: The small subunit of HL-A antigens is  $\beta_2$ -microglobulin. *J. Exp. Med.* **138**, 1608-1612 (1973).
  - 21) Rask, L., Ostberg, L., Lindblom, B., Fernstedt, Y. and Peterson, P. A.: The subunit structures of transplantation antigens. *Transplant. Rev.* **21**, 85-105 (1974).
  - 22) Nilsson, K., Evrin, P. E., Berggård, I. and Pontén, J.: Involvement lymphoid and non-lymphoid cells in the production of  $\beta_2$ -microglobulin—a homologue of the constant domains of IgG. *Nature New Biol.* **244**, 44-45 (1973).
  - 23) Strober, W. and Waldmann, T. A.: The role of the kidney in the metabolism of plasma proteins. *Nephron* **13**, 35-66 (1974).
  - 24) Graham, R. C. and Karnovsky, M. J.: Glomerular permeability. *J. Exp. Med.* **124**, 1123-1133 (1966).
  - 25) Oken, D. E. and Flamenbaum, W.: Micropuncture studies of proximal tube albumin concentrations in normal and nephrotic rats. *J. Clin. Invest.* **50**, 1498-1505 (1971).
  - 26) Cortney, M. A., Sawin, L. L. and Weiss, D. D.: Renal tubular protein absorption in the rat. *J. Clin. Invest.* **49**, 1-4 (1970).
  - 27) Straus, W.: Occurrence of phagosomes and phagolysosomes in different segments of the nephron in relation to the reabsorption, transport, digestion, and extrusion of intravenously injected horseradish peroxidase. *J. Cell Biol.* **21**, 295-308 (1972).
  - 28) Waldmann, T. A., Strober, W. and Mogielnicki, R. P.: The renal handling of low molecular weigh proteins II. Disorders of serum protein catabolism in patients with tubular proteinuria, the nephrotic syndrome, or uremia. *J. Clin. Invest.* **51**, 2162-2174 (1972).
  - 29) Franklin, E. C.: Physicochemical and immunologic studies of gamma globulins of normal human urine. *J. Clin. Invest.* **38**, 2159-2167 (1952).
  - 30) 上田 泰: 内科学の展望 (第1回). 腎疾患を中心として, (2) 蛋白尿. *日内会誌* **63**, 14-21 (1974).
  - 31) Poortmans, J. and Jeanloz, R. W.: Quantitative immunological determination of 12 plasma proteins excreted in human urine collected before and after exercise. *J. Clin. Invest.* **47**, 386-393 (1968).
  - 32) 石本二見男, 井上真夫, 園部昌彦, 赤羽清彬, 大野マサ: 腎機能検査の精度, 評価, 判定. 尿蛋白分析と腎機能. *綜合臨牀* **24**, 572-578 (1975).
  - 33) Harrison, J. F., Lunt, G. S., Scott, P. and Blainey, J. D.: Urinary lysozyme, ribonuclease, and low-molecular weight protein in renal disease. *Lancet* **1**, 371-375 (1968).
  - 34) 赤保内良和: Dys- および paraproteinemia 病態における免疫 globulin L 鎖 polypeptide の代謝に関する研究. *札幌医誌* **38**, 149-162 (1970).
  - 35) Peterson, P. A. and Berggård, I.: Isolation and properties of a human retinol-transporting protein. *J. Biol. Chem.* **246**, 25-33 (1971).
  - 36) 斎藤 寛, 古山 隆, 佐々木康彦, 塩路隆治, 田口喜雄, 提 榮昭, 阿保七三郎: 腎移植後の蛋白尿—acute rejection 早期診断. *医学のあゆみ* **82**, 766-767 (1972).
  - 37) Harrison, J. F., Blainey, J. D., Hardwicke, J., Rowe, D. S. and Soothill, J. F.: Proteinuria in multiple myeloma. *Clin. Sci.* **31**, 95-110 (1966).
  - 38) Wibell, L., Evrin, P. E. and Berggård, I.: Serum  $\beta_2$ -microglobulin in renal disease. *Nephron* **10**, 320-331 (1973).
  - 39) 河合 忠, 金 衡仁:  $\beta_2$ -microglobulin 定量の臨床的応用に関する研究 1. 腎疾患における血清・尿  $\beta_2$ -microglobulin の変動. *最新医学* **31**, 354-363 (1976).
  - 40) Evrin, P. E., Peterson, P. A., Wide, L. and Berggård, I.: Radioimmunoassay of  $\beta_2$ -microglobulin in human biological fluids. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **28**, 439-443 (1971).
  - 41) Evrin, P. E. and Wibell, L.: The serum levels and urinary excretion of  $\beta_2$ -microglobulin in apparently healthy subjects. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **29**, 69-74 (1972).
  - 42) 金 衡仁, 河合 忠: 血清  $\beta_2$ -microglobulin の正常値ならびに日内変動. *医学のあゆみ* **96**, 62-63 (1976).
  - 43) Davies, D. F. and Shock, N. W.: Age changes

- in glomerular filtration rate, effective renal plasma flow, and tubular excretory capacity in adult males. *J. Clin. Invest.* **29**, 496-507 (1950).
- 44) 浅野精一: Ageing と腎. 慶応医学 **46**, 251-257 (1969).
- 45) Kithier, K., Cejka, J., Belamaric, J., Al-Sarraf, M., Peterson, W. D. Jr., Vaitkevicius, V. K. and Poulik, M. D.:  $\beta_2$ -Microglobulin: occurrence in fetal life and malignancy. *Clin. Chim. Acta* **52**, 293-299 (1974).
- 46) Papper, S.: The effects of age in reducing renal function. *Geriatrics* **28**, 83-87 (1973).
- 47) 井上剛輔: 腎動脈の硬化とその臨床: 村上元孝, 亀山正邦: 内科シリーズ No. 20. 動脈硬化のすべて, 256-363, 南江堂, 東京 (1975).
- 48) Friedman, S. A., Raizer, A. E., Rosen, H., Solomon, N. A. and Wilfredo, S. Y.: Functional defects in the aged kidney. *Ann. Int. Med.* **76**, 41-45 (1972).
- 49) Bernier, G. M., Cohen, R. J. and Conrad, M. E.: Microglobulinaemia in renal failure. *Nature* **218**, 598-599 (1968).
- 50) 頼岡徳在, 大成浄志, 秋山実利, 小野哲也, 岡田啓成, 高杉敬久, 山木戸道郎, 西本幸男: 腎疾患ことに慢性血液透析における  $\beta_2$ -microglobulin. 臨床病理 **24**, 765-769 (1976).
- 51) Fermin, E. A., Johnson, C. A., Eckel, R. E. and Bernier, G. M.: Renal removal of low molecular weight proteins in myeloma and renal transplant patients. *J. Lab. Clin. Med.* **83**, 681-694 (1974).
- 52) 西岡文彦・他: 臨床血液. 投稿中.
- 53) 頼岡徳在, 大成浄志, 山木戸道郎, 西本幸男: ヒト腎尿細管上皮における  $\beta_2$ -microglobulin の沈着. 医学のあゆみ **99**, 20-22 (1976).